

Aus dem Robert-Koch-Institut Berlin
Leiter: Professor Dr. med. Georg Henneberg

VERGLEICH DER TITRATIONEN VON
TUBERKULIN UND HEPARIN
IM PHOTOMETRISCHEN HÄMAGGREGATIONSTEST

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Sebastian Lange
aus Prag

1969

Aus dem Robert Koch-Institut Berlin

Leiter: Professor Dr. med. Georg H e n n e b e r g

VERGLEICH DER TITRATIONEN VON

TUBERKULIN UND HEPARIN

IM PHOTOMETRISCHEN HÄMAGGREGATIONSTEST

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Sebastian Lange

aus Prag

Dekan : Professor Dr. med H.H. Naumann

Referent: Professor Dr. med. Georg Henneberg

Korreferent: Professor Dr. med. H.J. Dulce



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität

Promoviert am : 28.6.1969

VERGLEICH DER TITRATIONEN VON

TUBERKULIN UND HEPARIN

IM PHOTOMETRISCHEN HÄMAGGREGATIONSTEST



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I EINLEITUNG	2
II METHODIK	6
a) Prinzip der Methode	6
b) Materialien	7
1) Utensilien zur Photometrie	
2) Reagentien	
3) untersuchte Substanzen	
c) Durchführung der Titration	10
1) Pipettierschema	
2) photometrische Registrierung	
d) Rechnerische Auswertung	13
1) die hämaggregationshemmende Aktivität von Tuberkulin und Heparin	
2) die heparin- bzw. tuberkulinneutralisierende Aktivität von Protamin	
III ERGEBNISSE	18
a) Heparin im Hämaggregationstest	18
1) die Titration von Heparin	
2) die Aktivität von unterschiedlichen Heparinpräparaten	
3) die Neutralisation von Heparin durch Protaminsulfat	
b) Tuberkulin im Hämaggregationstest	30
1) die Titration von Tuberkulin	
2) die Neutralisation von Tuberkulin durch Protamin	
IV DISKUSSION	33
a) Vergleich der Reaktionen von Heparin und Tuberkulin im H ₂ -Test	
1) die hämaggregationshemmenden Aktivitäten von Heparin und Tuberkulin	
2) die Neutralisation von Heparin und Tuberkulin durch Protamin	
b) die Bedeutung der Heparinreaktion im Hämaggregationstest	40
1) Vergleich des H ₂ -Testes mit anderen Heparinnachweismethoden	
2) die Meßbarkeit der hämaggregationshemmenden Eigenschaft von Heparin	
V ZUSAMMENFASSUNG	44

LITERATURVERZEICHNIS

EINLEITUNG

Der photometrische Hämaggregationstest (H-Test) wurde 1964 von Drescher im Robert Koch Institut Berlin entwickelt (10). Das Prinzip dieser Methode besteht darin, daß trypsinierte Erythrocyten, die in einem ionenarmen, schwach sauren Glucosemilieu aufgeschwemmt werden, spontan aggregieren und daß diese Aggregation durch geeignete Agentien dosisabhängig gehemmt wird. Da der Grad der Hämaggregationshemmung photometrisch registriert werden kann, gelingt es, die Konzentration des hemmenden Agens zu bestimmen. Bisher wurden einige Virusantigene (Myxoviren, Enteroviren, Adenoviren), Tuberkulin und Nukleinsäuren im H-Test titriert (10, 11, 13, 41). Der Mechanismus der Hämaggregation ist im wesentlichen noch unbekannt. Es scheint jedoch, daß nur solche Substanzen die Aggregation hemmen, die durch ihre elektrische Ladung die Suspensionsstabilität der Erythrocyten verändern.

Die organische Verbindung im menschlichen Körper, die am leichtesten ionisierbar ist und in Lösung die stärkste elektrische Ladung trägt, ist das Mucopolysaccharid Heparin (17). Es lag deshalb nah, Heparin im H-Test zu untersuchen und seine Wirkung mit der anderer hämaggregationshemmender Agentien zu vergleichen. Zum Vergleich bot sich Tuberkulin an, da die Titration von Tuberkulin im H-Test wenig störanfällig ist und mit enger Streubreite gelingt.

Tuberkulin, ein Stoffwechselprodukt des *Mycobacterium tuberculosis*, wurde 1890 von Robert Koch entdeckt und ist bis zum heutigen Tag ein wichtiges

Hilfsmittel medizinischer Diagnostik geblieben, da mit ihm die für Tuberkuloseinfektionen spezifische Hautreaktion ausgelöst werden kann. Es gelang Drescher und Gillissen mit Hilfe des H-Testes, Tuberkulin in vitro zu titrieren. Dabei ergab sich, daß die hämaggregationshemmende Aktivität eines Tuberkulinpräparates mit der Hautaktivität streng korreliert ist und als Maß für diese gelten kann (12). Weiterhin ließen sich mit dieser Methode spezifische gegen Tuberkulin gerichtete Antikörper im Serum von Tuberkulosekranken und BCG-immunisierten Kaninchen nachweisen (20). Der Hämaggregationstest könnte deshalb für die Prüfung neuer Tuberkulinpräparate und vor allen für die Tuberkulosedagnostik in Zukunft Bedeutung gewinnen. Drescher zeigt, daß die im H-Test wirksame Fraktion des gereinigten Tuberkulins ein Protein ist (20). Die Wirkung, die dieses Protein auf die Hämaggregation hat, soll in der vorliegenden Arbeit mit der Wirkung von Heparin verglichen werden. Heparin ist, wie seit den Untersuchungen von Jorpes bekannt (24), ein sulfuriertes Mucopolysaccharid, und es ist demzufolge mit dem Tuberkuloprotein chemisch nicht verwandt. Jedoch könnte gerade der Vergleich zwischen zwei biochemisch so unterschiedlichen Substanzen Hinweise ergeben, wie der Reaktionsmechanismus der Hämaggregationshemmung zu erklären ist.

Heparin wurde 1916 von dem Medizinstudenten McLean aus Hundeleber isoliert und zwanzig Jahre später von Jorpes chemisch analysiert (34, 24). Als Antikoagulans gehört es zu den wirksamsten Arzneimitteln. Da Heparin als Makroanion mit den basischen Gruppen vieler biologisch aktiver Proteine reagiert, besitzt es mannigfaltige pharmakologisch und physiologisch wichtige Eigenschaften (17, 18).

Unter anderem stabilisiert es die Suspension von Erythrocyten (45). Kaulla und Roth zeigten, daß gewaschene Erythrocyten Heparin adsorbieren (27, 38). Andere Autoren beweisen, daß Heparin eine feste Bindung mit Eiweißen eingeht (6), und zeigen, daß es im Plasmamillieu vorwiegend mit den an Erythrocyten angelagerten Proteinen und nicht direkt mit der Erythrocytenoberfläche reagiert (18). Doch auch diese indirekte Bindung ändert das elektrische Oberflächenpotential der roten Blutzellen und damit ihre Suspensionsstabilität (18). So verlangsamt sich z. B. eine nach Westergreen pathologisch beschleunigte Blutsenkung, wenn dem Senkungsröhrchen Heparin zugesetzt wird (16). Auch durch intravenöse Heparinapplikation normalisiert sich bei einigen Patienten eine vorher beschleunigte Blutsenkung (3, 16).

Interessante therapeutische Aspekte ergaben sich aus der Entdeckung, daß Heparin im Tierversuch das sludged blood Phänomen (die intravasale Erythrocytenaggregation) verhindern kann. Zsoter erzeugte z. B. experimentell das sludge Phänomen am Mesoappendix der Ratte und konnte die Erythrocytenaggregate durch Heparin lösen (48). Auch klinisch wurde bereits das sludged blood Phänomen, wie es bei lokalen Erfrierungen, bei allergischen Zuständen und beim Morbus Menière auftritt, mit Heparin günstig beeinflußt (29, 40, 33, 30).

Tyrrell beschrieb 1967, daß Heparin in dem haemaggregation-pattern-test reagiert (42). Dieser Test modifiziert den H-Test insofern, als die Ergebnisse nicht photometrisch registriert sondern aus dem Muster (pattern) der Erythrocytensedimente abgelesen werden. Wie Tyrrell zeigte, hemmt Heparin unter den Bedingungen des pattern-testes die Zusammenballung der roten Blutzellen. Genauere quantitative Messungen der Heparinaktivität und

Angaben über Fehlerbreite und Reproduzierbarkeit liegen für diese Methode noch nicht vor.

Daß Heparin unter gewissen Voraussetzungen die Suspension roter Blutzellen stabilisiert, ist aus der Literatur bekannt. Ob diese Eigenschaft des Heparins quantitativ im photometrischen H-Test erfaßt werden kann, wird in der vorliegenden Arbeit untersucht. Dazu wird Heparin und eine bereits bekannte hämaggregationshemmende Substanz, das Tuberkulin, im selben Versuchsansatz titriert. Es stellen sich die Fragen:

- Kann Heparin im Hämaggregationstest qualitativ und quantitativ bestimmt werden?
- Kann die hämaggregationshemmende Aktivität von Tuberkulin reproduzierbar gemessen werden (11, 13)?
- Verändert Protamin unter den Bedingungen des Hämaggregationstestes die Heparin- bzw. die Tuberkulinaktivität?
- Wie unterscheidet sich das Verhalten von Heparin und Tuberkulin im Hämaggregations-test?

Im folgenden soll versucht werden, diese Fragen zu beantworten.

METHODIK

Prinzip der Methode

Der Hämaggregationstest gründet sich auf die Beobachtung, daß trypsinierte Erythrocyten, die in einem ionenarmen Glucosemilieu aufgeschwemmt wurden, spontan aggregieren und daß diese Aggregation durch geeignete Substanzen gehemmt werden kann. Erythrocytenaggregate sedimentieren schneller als einzeln suspendierte rote Blutzellen (16). Im Test sind deshalb nach einer geeigneten Reaktionszeit die Hämaggregate vollständig abgesunken, und die Konzentration der noch suspendierten Erythrocyten hat entsprechend abgenommen. Diese Konzentration wird photometrisch registriert und ist bei Proben, die hämaggregationshemmende Agentien enthalten, höher als bei Proben, in denen solche Agentien fehlen.

Die Konzentration des untersuchten Agens bestimmt das Ausmaß der Hämaggregationshemmung. Deshalb können hämaggregationshemmende Substanzen im H-Test titriert werden. Dies gelingt bisher bei einigen Viren, Nukleinsäuren, Tuberkulin und Heparin.

Materialien

- a) Utensilien zur photometrischen Bestimmung
Beckmann-Spektrophotometer Modell B: die Photo-
röhre Nr. 12055 wird ohne Filter verwendet. Die
Messungen werden bei einer Wellenlänge von
500 $m\mu$ vorgenommen. Das Meßabteil wird mit
Druckluft ventiliert. Um die Position der
Röhrchen im Strahlengang zu erhöhen, wird ein
Holzzyylinder (13 mm Höhe) in dem Röhrchenhalter
angebracht.

Beckmann Standard Röhrchen Nr. 12624. In diese
10 ml fassenden Teströhrchen werden die
Reagentien pipettiert. Nach dem Gebrauch
werden die Röhrchen, wie übrigens auch alle
benutzten Glaskolben und Pipetten, in Chrom-
schwefelsäure und destilliertem Wasser ge-
waschen.

- b) Reagentien

Im folgenden wird eine zusammengefaßte
Aufstellung der für den Hämaggregationstest
benötigten Reagentien gegeben. Detaillierte
Angaben zum Herstellen der Lösungen finden
sich bei Drescher (11).

- 1) Pufferlösung pH 7.0: 1/1500 M Phosphatlösung
(KH_2PO_4 und $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ in Aqua
bidestillata)
- 2) Pufferlösung pH 5: Ein Gemisch aus 0,1 M
Bernsteinsäure und 0,1 M Borax
- 3) NaCl Lösung: 1,125 g/ ad 100 ml Puffer pH 7.0
- 4) Glukoselösung: 0,454 M und 0,908 M Glukose
(pro analysi Präparat der Firma
Serva) in Puffer pH 7.0

- 5) Albuminlösung: 1,0 g Human Albumin (Behringwerke AG Marburg Charge 29 36) werden in 100 ml 1/375 M Phosphatpufferlösung pH 7,0 gelöst. Die Lösung wird 30 min. bei 56° C erhitzt und danach vor Verwendung mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur aufbewahrt.
- 6) Erythrocytensuspension: Menschliche Erythrocyten der Blutgruppe O Rh werden in 0,454 M Glukoselösung dreimal gewaschen und danach 60 Minuten bei 24° C mit einer 0,05% gepufferten Trypsinlösung (Worthington lyophilized Trypsin, crystallized, salt free batch TL 44-15) inkubiert. Das durch anschließende Zentrifugation gewonnene Sediment kann bis zu 4 Tagen bei 4° C aufbewahrt werden. Am Versuchstag wird dieses Sediment in gepufferter 0,454 M Glukoselösung aufgeschwemmt und zwar so, daß die Suspension 2,15 - 2,35 Vol % Erythrocyten enthält.

c) untersuchte Substanzen

Die folgenden Präparate wurden im H-Test untersucht:

- 1) Heparin Hoffmann La Roche, trocken,
108-110 USP.E Pro mg, Charge
G 605036
- 2) Heparin-Na Nordmark-Werke Hamburg, trocken,
125 USP.E pro mg Charge P 686/8
- 3) Liquemin Deutsche Hoffmann la Roche
5000 IE/ml Reg.Nr. L 50-2
- 4) Heparin Novo Novo Industrie GmbH
5000 IE/Ml Charge 12 16
- 5) Thromboliquin Heparin Organon NV Organon
Oss Holland 5000 IE/ml Charge 5062

6) Thrombophob ad inj. Nordmark Werke Hamburg
5000 IE/ml Charge 172

7) Gereinigtes Tuberkulin Hoechst Behringwerke
50 000 IE/mg Charge 25

Zur Neutralisation der Tuberkulin- bzw. Heparin-
wirkung wurde

8) Protaminsulfat Novo antidotum Heparini
1% Lösung Novo Industrie GmbH

verwendet. In Vorversuchen wurde gezeigt, daß das Sulfat des Protamins in den zur Heparinneutralisation benötigten Konzentrationen die Hämagggregation selbst nicht beeinflußt. Die heute meist im Handel erhältlichen Hydrochloridverbindungen des Protamin hemmen selbst die Hämagggregation und können deshalb im H-Test nicht zur Heparinneutralisierung verwendet werden.

Durchführung der Heparin-, Tuberkulin- und Protaminbestimmung im Hämaggregationstest.

Tabelle 1 zeigt anhand eines Beispiels Menge und Konzentration der in den einzelnen Teströhrchen enthaltenen Lösungen. Der Inhalt der Röhrchen unterscheidet sich in den ersten 0,5 ml; und zwar enthalten:

- 1) Röhrchen 1-4: je 0,5 ml Pufferlösung pH 7.0
- 2) Röhrchen 5-9: je 0,5 ml 1,125 % NaCl Lösung
- 3) Röhrchen 10-16: je 0,5 ml Heparinlösung (bzw. 0,5 ml Tuberkulinlösung) in progressiv geometrischer Verdünnungsreihe. (Eine für den Test geeignete Ausgangsverdünnung wird in Vorversuchen bestimmt und durch Verdünnung mit Pufferlösung pH 7.0 hergestellt.)
- 4) Röhrchen 17-20: je 0,25 Heparinlösung 1 mg/50 ml (bzw. 0.25 Tuberkulinlösung 1 mg/2ml) 0,25 Pufferlösung pH 7.0
- 5) Röhrchen 21-22: je 0,25 Pufferlösung pH 7.0 0,25 Protaminlösung in geometrisch progressiv verdünnte Reihe.
- 6) Röhrchen 23-27: je 0,25 ml Heparinlösung 1 mg/50 ml (bzw. 0.25 ml Tuberkulinlösung 1 mg/2 ml) 0,25 ml Protaminlösung in geometrisch progressiv verdünnte Reihe.

Die übrigen Reagentien sind für alle Teströhrchen gleich. Die Pufferlösung pH 5.0, 1% Albuminlösung und die 0,908 M Glukoselösung werden

	Heparin			Protamin			1	2	3	4	5	Extinktion
	Nr.	ml	VV	EV	ml	VV	ml	ml	ml	ml	mim	
Kontrollen	2-4						0.5		2.5	2.0	240	1.05 (=E1) 1.45 (=E2)
	5-9							0.5	2.5	2.0	240	
Heparinver- dünnungsreihe	10	0.5	80	800					2.5	2.0	240	2.15
	11	0.5	160	1600					2.5	2.0	240	1.94
	12	0.5	320	3200					2.5	2.0	240	1.58
	13	0.5	640	6400					2.5	2.0	240	1.35
	14	0.5	1280	12800					2.5	2.0	240	1.20
	15	0.5	2560	25600					2.5	2.0	240	1.11
	16	0.5	5120	51200					2.5	2.0	240	1.08
Heparinkon- trolle 1γ/ml	17-20	0.25	50	1000			0.25		2.5	2.0	240	2.10
Protaminkon- trollen	21				0.25	40	800	0.25	2.5	2.0	240	0.99
	22				0.25	80	1600	0.25	2.5	2.0	240	0.99
Protaminver- dünnungsreihe + konstante Heparinmenge (1γ/ml)	23	0.25	50	10000	0.25	40	800		2.5	2.0	240	1.14
	24	0.25	50	10000	0.25	80	1600		2.5	2.0	240	1.71
	25	0.25	50	10000	0.25	160	3200		2.5	2.0	240	2.02
	26	0.25	50	10000	0.25	320	6400		2.5	2.0	240	2.04
	27	0.25	50	10000	0.25	640	12800		2.5	2.0	240	2.10

- 1 Pufferlösung pH 7.0
- 2 NaCl lösung 1,125%
- 3 Gemisch aus Albuminlösung, Glukoselösung, Pufferlösung pH 5.0
im Verhältnis 0,5:1.0:1.0
- 4 Erythrocytensuspension
- 5 Sedimentationzeit
- VV Vorverdünnung EV Endverdünnung im Meßröhrchen

in einem Verhältnis 1:0,5:1 gemischt und 2,5 ml dieser Mischung in jedes Teströhrchen gegeben. Anschließend werden die Teströhrchen $1/2$ bis $1\ 1/2$ Stunden in einer abgeschlossenen Kammer bei 24° C gehalten, ehe sie mit der Erythrocyten-suspension beschickt werden.

Die Erythrocytensuspension wird wie angegeben bereitet und anschließend bei $13,5-15,5^{\circ}$ C $1/2$ Stunde lang magnetisch gerührt, um die vorhandenen Erythrocytenaggregate zu lösen. In die Teströhrchen werden in einem gleichmäßigen Zeitabstand (30 Sek.) je 2,0 ml Erythrocyten-suspension pipettiert. Während des Pipettierens wird die noch nicht verbrauchte Suspension weiter gerührt, um die Ausbildung neuer Aggregate zu verhindern. Danach werden die Teströhrchen 2-4 Stunden in der Temperaturkammer bei 24° C gehalten. Die photometrische Ablesung soll dann beginnen, wenn die Kontrollröhrchen 1-4 eine Extinktion von 0,9 bis 1,10 aufweisen (10). Um diesen Zeitpunkt zu finden, mißt man in regelmäßigen Abständen die Extinktion des Röhrchens Nr. 1, bis dieses den geforderten Wert zeigt. Das Röhrchen Nr. 1 wird bei der späteren Auswertung nicht berücksichtigt. Die Bestimmung der Extinktionen erfolgt in den gleichen Zeitabständen, in denen die Erythrocytensuspension pipettiert wurde. Dadurch werden alle Proben nach einer konstanten Sedimentationszeit abgelesen. Gelegentlich können sich an einer Wand von nicht lotrecht stehenden Röhrchen Erythrocytenaggregate anlagern. Diese Teströhrchen werden so in das Meßabteil gestellt, daß der Strahlengang nicht durch die angelagerten Aggregate zieht.

Rechnerische Auswertung

- 1) Die hämaggregationshemmende Aktivität von Heparin und Tuberkulin

- a) Berechnung der Bezugsextinktion E_{100}

$$E_{100} = E_1 \cdot 0,63 + E_2 \cdot 0,37$$

In dieser Gleichung bedeutet:

E_1 : die arithmetrisch gemittelte Extinktion der Röhren 2-4 (diese Proben haben maximale Hämaggregation, da sie keine hämaggregationshemmenden Substanzen enthalten)

E_2 : die arithmetrisch gemittelte Extinktion der Röhren 5-9 (in diesen Proben ist die Hämaggregation teilweise durch NaCl gehemmt)

Die Faktoren 0,63 und 0,37 wurden empirisch gefunden (10). Es zeigte sich nämlich, daß gleiche Konzentrationen der im H-Test untersuchten Substanzen je nach Reaktionsfähigkeit der Erythrocyten unterschiedliche hämaggregationshemmende Aktivitäten besaßen. Diese Unterschiede waren jedoch in dem Bereich am geringsten, der bei einer durch die obige Gleichung ermittelten Extinktion E_{100} lag.

- b) Berechnung der reziproken Heparin- bzw. Tuberkulinkonzentration d_{100} .

Die reziproke Heparin- bzw. Tuberkulinkonzentration, die im Test eine Extinktion vom Wert E_{100} verursacht, wird d_{100} genannt. Diese Konzentration wird aus den untersuchten Verdünnungsstufen und ihren Extinktionen extrapoliert. Dazu werden in doppelt logarithmischem Maßstab die reziproken Heparin- bzw. Tuberkulinkonzentrationen zu ihren Extinktionen aufgetragen. Durch die aufgetragenen Punkte derjenigen vier Verdünnungsstufen, innerhalb derer die Extinktion am steilsten

abfällt, wird graphisch oder rechnerisch (Methode der kleinsten Quadrate) eine Regressionsgerade gelegt:

$$\log E = s \cdot \log d + e \quad (I)$$

(E = Extinktion

s = Anstieg

d = reziproke Heparin- bzw. Tuberkulinkonzentration

e = Verschiebung der Geraden)

Der d_{100} Wert wird nun mit Hilfe des bekannten E_{100} Wertes auf der Geraden abgelesen oder aus der Gleichung (I) berechnet.

c) Berechnung der hämaggregationshemmenden Aktivität (HIU/mg)

Definitionsgemäß besitzt die Konzentration d_{100} eine hämaggregationshemmende Aktivität von 100 HIU (hemaggregation inhibiting units).

Um zu berechnen wieviel HIU ein Milligramm eines Heparinpräparates enthält, gilt die Gleichung:

$$A = d_{100} \cdot 100 \text{ HIU pro mg}$$

(A = hämaggregationshemmende Aktivität

d_{100} = reziproke Heparinkonzentration bzw. Tuberkulinkonzentration, die eine Extinktion E_{100} bewirkt.

HIU = hemaggregation inhibiting units)

2) Die heparin- und tuberkulinneutralisierende Aktivität von Protaminsulfat

a) Berechnung der Abhängigkeit von Extinktion und hämaggregationshemmender Aktivität

Die Funktion

$$E = f(c)$$

(E = Extinktion, c = hämaggregationshemmende Aktivität gemessen in HIU) wird linear,

wenn man sie im doppelt logarithmischen Maßstab aufträgt.

$$\log E = s \cdot \log c + e$$

Diese Gerade hat den negativen Anstieg der Gleichung (I) und geht durch den Punkt mit den Koordinaten $\log E_{100}$ und $\log 100$ HIU. Daher ist sie hinreichend gekennzeichnet und ihre Gleichung kann berechnet werden.

$$\log E = -s \cdot \log c + s \cdot \log 100 + \log E_{100}$$

und entlogarithmiert

$$E = \left(\frac{c}{100}\right)^{-s} \cdot E_{100} \quad (II)$$

Die Gleichung (II) ist die Regression von der Extinktion zur hämaggregationshemmenden Aktivität. Ist die Extinktion eines Teströhrchens bekannt, so kann seine hämaggregationshemmende Aktivität auf der Geraden abgelesen werden.

b) Berechnung des neutralisierten Anteils der hämaggregationshemmenden Aktivität (9)

Der durch Protamin neutralisierte Anteil einer Heparin- bzw. Tuberkulinaktivität wird durch den Quotienten $c-c_1/c$ beschrieben. Dieser Quotient wird aus Gleichung II und den Extinktionen der untersuchten Heparin-Protamin-Mischungen bzw. Tuberkulin-Protamin-Mischungen berechnet. Es bedeutet : c die hämaggregationshemmende Aktivität der Heparin- bzw. Tuberkulinkontrolle (s. Pipettierschema)

c_1 die Aktivität einer Heparin-Protamin-Mischung bzw. die Aktivität einer Tuberkulin-Protamin-Mischung

$c-c_1$ den Aktivitätsverlust von Heparin bzw. Tuberkulin.

Wird dieser Aktivitätsverlust auf die Ausgangsaktivität bezogen, so resultiert der neutralisierte Anteil der hämaggregationshemmenden Aktivität $c-c_1/c$. Tabelle 2 zeigt anhand eines Beispiels die Berechnung von $c-c_1/c$.

c) Berechnung der Protaminkonzentration $C_{50\%}$

$C_{50\%}$ ist die Protaminkonzentration, die 50 % der hämaggregationshemmenden Aktivität einer bestimmten Heparin- bzw. Tuberkulinkonzentration neutralisiert. Auf einem Koordinatensystem wird der neutralisierte Anteil einer hämaggregationshemmenden Aktivität zu der zur Neutralisation benötigten Protaminkonzentration aufgetragen.

$$\text{Protaminkonzentration} = F \left(\frac{c-c_1}{c} \right)$$

Graphisch wird die Protaminkonzentration bestimmt, bei der der Quotient $c-c_1/c$ den Wert 0,5 hat, und damit ist die $C_{50\%}$ Konzentration gefunden.

Tabelle Nr. 2

Heparin mg/ml	c HIU	Protamin mg/ml	c ₁ HIU	c-c ₁ HIU ¹	$\frac{c-c_1}{c}$	Protaminkonz., für die gilt: $\frac{c-c_1}{c} = 0,5$
1000 ⁻¹	1600	800 ⁻¹	140	1460	0,91	1700 ⁻¹ mg/ml
"	"	1600 ⁻¹	700	900	0,56	
"	"	3200 ⁻¹	1350	250	0,16	
"	"	6400 ⁻¹	1400	200	0,12	
"	"	12800 ⁻¹	1600	0	0,00	

Berechnung der Protaminkonzentration, die 50% der hämaggregationshemmenden Aktivität einer Heparinkonzentration (1/1000 mg/ml) neutralisiert.

c= Aktivität des Heparins ohne Protamin

c₁= Aktivität der Heparin-Protamin-Mischung

ERGEBNISSE

a) Heparin im Hämaggregationstest

1) die Titration von Heparin

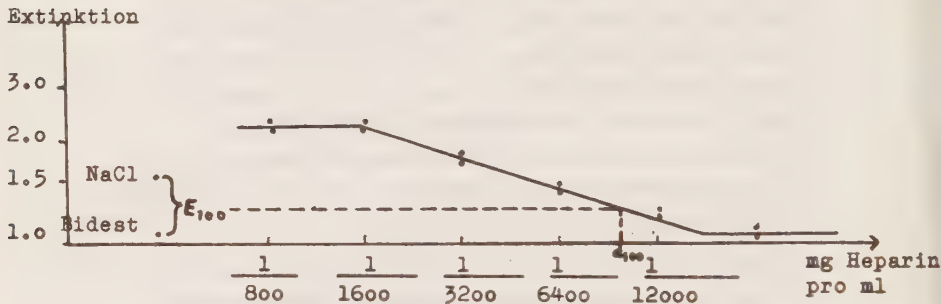
Die Versuche zeigen, daß Heparin in dem von Drescher entwickelten Hämaggregationstest reagiert. Heparin hemmt die Aggregation von Erythrocyten. Die Stärke dieser Hemmung ist von der Heparinkonzentration abhängig. Da die Stärke der Hämaggregationshemmung photometrisch registriert werden kann, gelingt es, die Heparinkonzentration einer Probe zu bestimmen.

Stellt man eine Verdünnungsreihe von Heparin her und beschickt die Meßröhrchen mit den in Tabelle 1 angegebenen Reagentien, so finden sich im Prinzip folgende Ergebnisse:

- Hohe Heparinkonzentrationen hemmen die Hämaggregation maximal. Die mittlere Sedimentationsgeschwindigkeit der suspendierten Erythrocyten ist maximal verlangsamt. Nach der geforderten Reaktionszeit wird die Lichtextinktion der Probe hohe Werte im Vergleich zur heparinfreien Kontrolle haben. (Maximale Hämaggregationshemmung wird von Heparinkonzentrationen größer als 1 Gamma/ml verursacht; eine weitere Steigerung der Konzentration führt nicht zu einer meßbaren Verstärkung der Hämaggregationshemmung.)
- Niedrige Heparinkonzentrationen (weniger als 1/20 Gamma pro ml) hemmen die Hämaggregation nicht, Die Lichtextinktion der Probe entspricht der einer heparinfreien Kontrolle.
- Mittlere Heparinkonzentrationen hemmen dosisabhängig die Hämaggregation. In einem Konzentrationsbereich zwischen 1 Gamma/ml und 1/20 Gamma pro ml sinkt mit abnehmender Heparinkonzentration auch seine hämaggregationshemmende

Abb.Nr.1:Extinktion der Erythrocyten-Heparin-Mischung
als Funktion der Heparinkonzentration

Kontrollen	maximale HAH ⁺	dosisabhängige HAH ⁺	nicht meßbare HAH ⁺
------------	------------------------------	------------------------------------	-----------------------------------



+ Hämaggregationshemmung

- 1) Mit abnehmender Heparinkonzentration vermindert sich die hämaggregationshemmende Wirkung, und die Extinktion sinkt, bis sie etwa den Wert der Leerkontrolle (BiDest) erreicht hat.
- 2) Aus den Extinktionswerten der Kontrollen BiDest und NaCl wird E_{100} berechnet. Auf der Regressionsgeraden wird die zu E_{100} gehörende Heparinkonzentration (d_{100}) abgelesen.

Tab 3: Fehlerbreite der Heparinbestimmung⁺ im
Haemaggregationstest

Test Nr	HIU ⁺⁺ /mg	Test Nr	HIU/mg
1	1050 000	13	1500 000
2	1100 000	14	1000 000
3	1050 000	15	900 000
4	1100 000	16	1150 000
5	1000 000	17	1100 000
6	1250 000	18	900 000
7	900 000	19	700 000
8	1000 000	20	1000 000
9	850 000	21	1200 000
10	1350 000	22	900 000
11	1100 000	23	1050 000
12	850 000		
Mittelwert		1045 000	
Standardabweichung		171 500	
Varationskoeffizient		0,164	

+ Für die Versuche wurde das Präparat Heparin La Roche
Standard Trockensubstanz verwendet

++ HIU (haemaggregation inhibiting units) Maßeinheit der
hämaggregationshemmenden Aktivität

Wirkung. Die Lichtextinktion dieser Proben, liegt zwischen den Werten, die Proben mit maximaler Hämaggregationshemmung einerseits und Proben ohne Hämaggregationshemmung andererseits verursachen.

Im Versuch werden die Heparinkonzentrationen so gewählt, daß möglichst viele in den Bereich dosisabhängiger Hämaggregationshemmung fallen. Abb. 1 und Abb. 6 zeigen an einem Beispiel die Beziehung zwischen Extinktion (als Maß der Hämaggregationshemmung) und Heparinkonzentration. Im Bereich dosisabhängiger Hämaggregationshemmung kann die Beziehung zwischen Extinktion und Heparinkonzentration durch die Regressionsgerade

$$\text{Log } E = s \log c + e$$

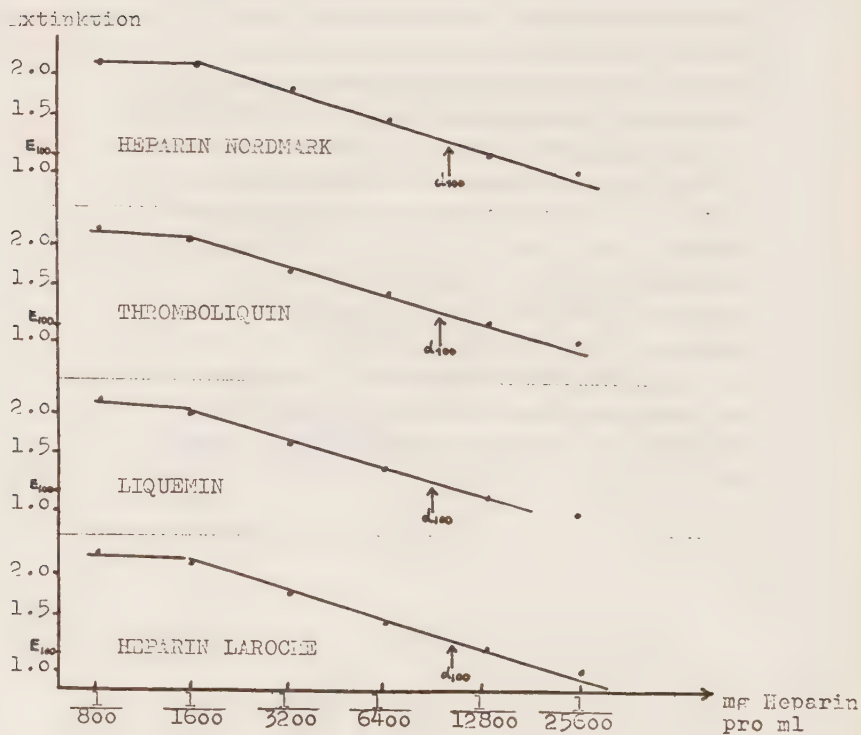
charakterisiert werden. Diese Funktion läßt bei bekannter Bezugsextinktion E_{100} (s. rechnerische Auswertung) die hämaggregationshemmende Aktivität eines Heparinpräparates berechnen. Tabelle 3 zeigt die Fehlerbreite, die bei der Bestimmung der hämaggregationshemmenden Aktivität auftritt. Die Standardabweichung von 16 % liegt in der gleichen Größenordnung wie sie bei der Titration anderer Substanzen im Hämaggregationstest gefunden wird.

2) Die Aktivität von unterschiedlichen Heparinpräparaten.

Es wurde die Wirkung von sechs unterschiedlichen Heparinpräparaten auf die Hämaggregation untersucht (s. Tab. 4). Alle Präparate reagieren im H-Test wie oben beschrieben: hohe Heparinkonzentrationen hemmen die Hämaggregation maximal, bei mittleren Konzentrationen verringert sich die Hämaggregationshemmung parallel zur Konzentrationsabnahme, und schließlich ist eine

hämaggregationshemmende Aktivität bei niedrigen Heparinkonzentrationen nicht mehr meßbar (s. Abb. 2). Nach der angegebenen Formel (s. S. ¹⁴) werden die hämaggregationshemmenden Aktivitäten berechnet. In Tabelle Nr. 4 sind die arithmetisch gemittelten Titer der sechs untersuchten Präparate gegenübergestellt. Die im H-Test gefundenen Einheiten (HIU) können einerseits auf die antikoagulatorischen Einheiten (USP.E) und andererseits auf das Gewicht (mg) der Heparintrockensubstanz bezogen werden. Die so gefundenen Titer HIU/USP.E und HIU/mg liegen zwar bei allen Heparinpräparaten in der gleichen Größenordnung (Abweichung weniger als 90 %) einige unterscheiden sich jedoch signifikant ($p < 0,01$). Dies bedeutet, daß gleiche Mengen verschiedener Heparinpräparate nicht die gleiche hämaggregationshemmende Aktivität besitzen müssen und daß in den einzelnen Präparaten das Verhältnis von hämaggregationshemmender Aktivität zur antikoagulatorischen Aktivität nicht konstant ist.

Abb 2: Die Extinktion der Erythrocyten-Heparin-Mischung
als Funktion der Konzentration verschiedener
Heparinpräparate.



Tab. 4 : Zusammenstellung der Titer
verschiedener Heparinpräparate

Präparat	USP.E/mg	HIU/mg	HIU/USP.E
La Roche Stand	109	1045 000	9500
Nordmark Stand	125	1288 000	10300
Heparin Novo	100	1523 000	15200
Thrombophob	100	1315 000	13200
Liquemin	100	1055 000	10600
Thromboliquin	100	1110 000	11100

USP.E : antikoagulatorische Einheiten

HIU : hemaggregation inhibiting units

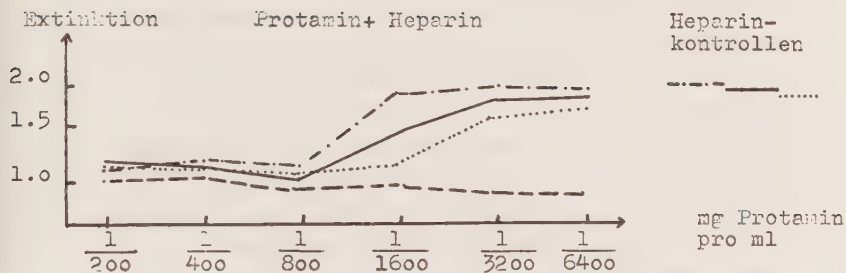
3) Die Neutralisation von Heparin durch Protamin

Es ist bekannt, daß Protaminsulfat die antikoagulatorischen Wirkung von Heparin neutralisiert (5). Die Versuche zeigen, daß Protamin ebenfalls die hämaggregationshemmende Aktivität von Heparin aufheben kann. Füllt man in Meßröhrchen, die eine bekannte Heparinmenge enthalten, Protaminsulfat in absteigenden Konzentrationsstufen, so findet man je nach Mischungsverhältnis zwischen Heparin und Protamin folgende Ergebnisse:

- 1) Das Meßröhrchen enthält Protamin im Überschuß. Das vorhandene Heparin wird vollständig neutralisiert. Die Lichtextinktion der Probe entspricht der einer heparinfreien Kontrolle.
- 2) Die Protaminmenge ist zu gering, um das vorhandene Heparin meßbar zu neutralisieren. Heparin besitzt seine volle hämaggregationshemmende Aktivität. Die Lichtextinktion entspricht der einer heparinhaltigen Kontrolle ohne Protaminzusatz.
- 3) Protamin neutralisiert einen Teil der vorhandenen Heparinmenge. Heparin hat seine hämaggregationshemmende Wirkung teilweise verloren. Die Lichtextinktion dieser Probe liegt zwischen der einer heparinhaltigen Kontrolle ohne Protamin und der einer heparinfreien Kontrolle.

Die Abbildungen 3 und 8 demonstrieren diese Er-

Abb 3: Die Neutralisierung der hämaggregations-
hemmenden Wirkung von Heparin durch
Protaminsulfat



- Protaminverdünnungsreihe
- · - · - Protamin + 1/1000 mg Heparin pro ml
- Protamin + 1/1600 mg Heparin pro ml
- Protamin + 1/2000 mg Heparin pro ml

gebnisse. Bei konstanter Heparinmenge ist die Extinktion eines Meßröhrchens von dessen Protaminkonzentration abhängig. Abbildung 3 läßt weiterhin erkennen, daß Protamin in den zur Neutralisation benötigten Konzentrationen allein im H-Test nicht reagiert. Erhöht man jedoch die Protaminkonzentration im Meßröhrchen, so wirkt auch Protamin allein hämaggregationshemmend. Solche hohen Protaminkonzentrationen sind natürlich für die Neutralisationsversuche nicht brauchbar.

Im Versuch sollen mehrere Protaminverdünnungsstufen zwischen den beiden Konzentrationen liegen, von denen die eine zur vollständigen und die andere zur eben nicht mehr meßbaren Heparinneutralisierung führen. Dadurch gelingt es, eine Beziehung zwischen neutralisiertem Heparinanteil und der zu dieser Neutralisation benötigten Protaminmenge herzustellen. Weiterhin kann diejenige Protaminkonzentration ($C_{50\%}$) gefunden werden, die 50 % der vorhandenen Heparinmenge neutralisiert. Dieser $C_{50\%}$ Wert kann bei bekannter Heparinmenge als Maß für die heparinneutralisierende Aktivität einer Protaminprobe gesetzt werden. Abb. 5 und Tabelle 5 zeigen die Reproduzierbarkeit der $C_{50\%}$ Werte im H-Test. Die Standardabweichung von 23% liegt geringfügig über der Fehlerbreite, die man bei Titrationen von Heparin bzw. von Tuberkulin im Hämaggregations-test findet.

Die Protaminkonzentration $C_{50\%}$ ist von der im Teströhrchen vorhandenen Heparinmenge abhängig. Kleine Heparinmengen können von kleinen Protaminmengen neutralisiert werden, große Heparinmengen

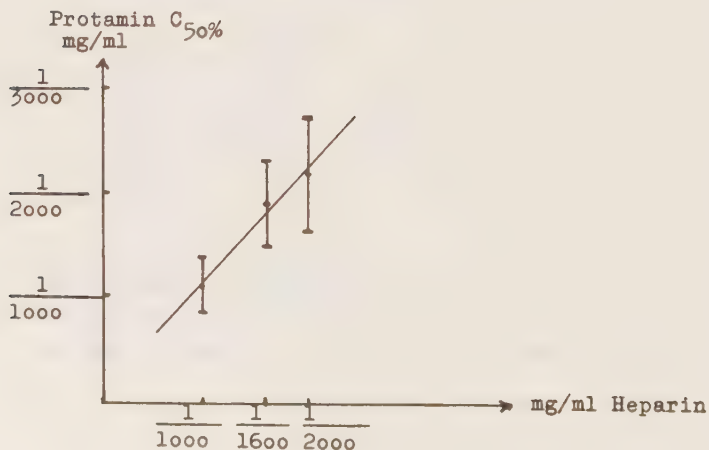
benötigen zur Neutralisierung große Mengen Protaminsulfat. Abb. 3 zeigt, daß die Neutralisationskurve mit abnehmender Heparinkonzentration in Richtung geringerer Protaminkonzentrationen verschoben wird. Daraus folgt, daß die zu neutralisierende Heparinkonzentration und der $C_{50\%}$ Wert direkt proportional sind. In Tabelle 5 und Abbildung 5 sind die Protaminkonzentrationen aufgetragen, die 50% der hämaggregationshemmenden Aktivität von drei unterschiedlichen Heparinkonzentrationen aufheben. Zumindest im Bereich der untersuchten Heparinkonzentrationen besteht eine angenähert lineare Abhängigkeit zwischen Heparinmenge und $C_{50\%}$ Werten.

Tab 5 : Abhängigkeit der Protaminkonzentration $C_{50\%}$
von der zu neutralisierenden Heparinmenge

reziproke Heparin- konzentration(mg/ml)	reziproke Werte(mg/ml)der Protaminkonzentration $C_{50\%}$	
	x	s
1000	1135	$\pm 262(+_{23\%})$
1600	1932	$\pm 402(\pm 20,8\%)$
2000	2214	$\pm 516(\pm 23,3\%)$

$C_{50\%}$:Protaminkonzentration, die 50% der hämaggre-
gationshemmenden Aktivität der angegebenen
Heparinkonzentration neutralisiert

Abb 5 : Graphische Darstellung der Tabelle



b) Tuberkulin im Hämaggregationstest

1) Die Titration von Tuberkulin

Die Versuche zeigen, daß Tuberkulin im Hämaggregationstest mit großer Empfindlichkeit titriert werden kann. Damit werden die Arbeiten von Drescher (11, 14) bestätigt.

Untersucht man eine geometrisch progrediente Verdünnungsreihe von Tuberkulin im H-Test, so finden sich im Prinzip folgende Ergebnisse:

- 1) Hohe Tuberkulinkonzentrationen hemmen die Hämaggregation maximal; eine Steigerung der Konzentration führt nicht zu einer meßbaren Verstärkung der Hämaggregationshemmung.
- 2) Mittlere Tuberkulinkonzentrationen (zwischen $1/40$ und $1/500$ mg GT pro ml) hemmen dosisabhängig die Hämaggregation, d. h. die Tuberkulinkonzentration und das Ausmaß der HA-hemmung sind proportional. Da andererseits die Lichtadsorption vom Grad der HA-hemmung abhängt, kann aus einer gemessenen Extinktion auf die in der Probe vorhandene Tuberkulinkonzentration geschlossen werden.
- 3) Niedrige Tuberkulinkonzentrationen hemmen die Hämaggregation nicht.

Die hämaggregationshemmende Aktivität eines Tuberkulinpräparates wird wie angegeben (siehe rechnerische Auswertung) berechnet. Tabelle 3 zeigt an Hand eines Beispiels die Fehlerbreite, die bei der Titerbestimmung in verschiedenen Versuchsanordnungen auftritt.

Tab 6 : Fehlerbreite der Tuberkulintiter⁺
im Hämaggregationstest

Test Nr.	HIU/mg ⁺⁺	Test Nr.	HIU/mg
1	32 000	8	63 000
2	58 000	9	60 000
3	32 000	10	44 000
4	55 000	11	52 000
5	34 000	12	52 000
6	39 000	13	60 000
7	55 000	14	60 000
Mittelwert		46 400	
Standardabweichung		11 470	
Variationskoeffizient		0,25	

+ Für die Versuche wurde das Präparat GT Hoechst
Charge 25 verwendet

++ HIU= hemaggregation inhibiting units

2) Die Neutralisation von Tuberkulin durch Protamin

Da Protaminsulfat die Aktivität von Heparin im H-Test neutralisiert, stellte sich die Frage, ob Protamin in ähnlicher Weise auf Tuberkulin wirkt. In Reagenzgläser wurden gleiche Mengen eines Tuberkulinpräparates und unterschiedliche Konzentrationen (im Sinne einer geometrischen Verdünnungsreihe) von Protaminsulfat gefüllt. Die Versuche zeigten im Prinzip folgende Ergebnisse:

Eine hohe Protaminkonzentration kann die vorhandene Tuberkulinmenge vollständig neutralisieren und die Hämaggregation wird dadurch so ablaufen, als ob kein Tuberkulin im Teströhrchen vorhanden wäre. Sehr geringe Protaminkonzentrationen können das Tuberkulin nicht neutralisieren, hemmen also auch nicht seinen Einfluß auf die Erythrocyten. Findet sich jedoch Protamin in mittleren Konzentrationen (1/100 mg bis 1/1000 mg pro ml) in den Meßröhrchen, so wird das Tuberkulin nur teilweise neutralisiert und der nicht neutralisierte Anteil behält seine hämaggregationshemmende Wirkung; die Reaktion wird in diesen Proben so ablaufen, als ob in ihnen eine verminderte Tuberkulinkonzentration vorhanden wäre. Abb. 7 zeigt, wie bei konstanter Tuberkulinmenge die Extinktion (als Maß der Hämaggregationshemmung) allein von der im Meßröhrchen vorhandenen Protaminmenge abhängt. Aus den gefundenen Meßdaten kann diejenige Protaminmenge bestimmt werden, die 50% des Tuberkulins im Meßröhrchen neutralisiert (s. rechnerische Auswertung). Diese Protaminkonzentration $C_{50\%}$ kann als Maß für die tuberkulinneutralisierende Aktivität eines Protaminpräparates definiert werden. Zur 50 %igen Neutralisation von 1000 HIU ($= 1/40$ mg/ml) Tuberkulin werden z. B. im Mittel $2,5 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ Protamin pro ml benötigt (Standardabweichung 34 %, s. Tab. Nr. 7).

DISKUSSION

a) Vergleich der Reaktionen von Heparin und Tuberkulin im H-Test

1) Die hämaggregationshemmende Aktivität von Tuberkulin und Heparin

Tuberkulin und Heparin hemmen unter den Bedingungen des H-Testes die Zusammenballung von Erythrocyten. Das Ausmaß dieser Hämaggregationshemmung ist von der Konzentration der genannten Substanzen abhängig. Diese Abhängigkeit kann in einem mittleren Konzentrationsbereich durch eine logarithmische lineare Funktion beschrieben werden. Das Ausmaß der Hämaggregationshemmung kann photometrisch erfaßt werden und erlaubt wegen der beschriebenen Abhängigkeit die Berechnung der Heparin- bzw. Tuberkulinkonzentration. Deshalb können diese Substanzen im H-Test titriert werden. Das Verhalten von Heparin und Tuberkulin gleicht somit formal den Reaktionen, die Drescher für andere hämaggregationshemmende Agentien wie Nukleinsäuren, Myxoviren, Enteroviren und Adenoviren gefunden hat (10, 41, 13).

Vergleicht man die hämaggregationshemmende Aktivität von Tuberkulin und Heparin, so findet sich ein Verhältnis von 1 : 20 (s. Tab. Nr. 7). Drescher stellt die Hypothese auf, daß die hämaggregationshemmenden Agentien von den Erythrocyten adsorbiert werden und über eine Änderung des Oberflächenpotentials die Zusammenballung der roten Blutzellen hemmen. Die wesentlich höhere Aktivität von Heparin ließe sich demnach durch seine Affinität zum Erythrocyten und durch seine stark negative Ladung als Polyanion erklären (17).

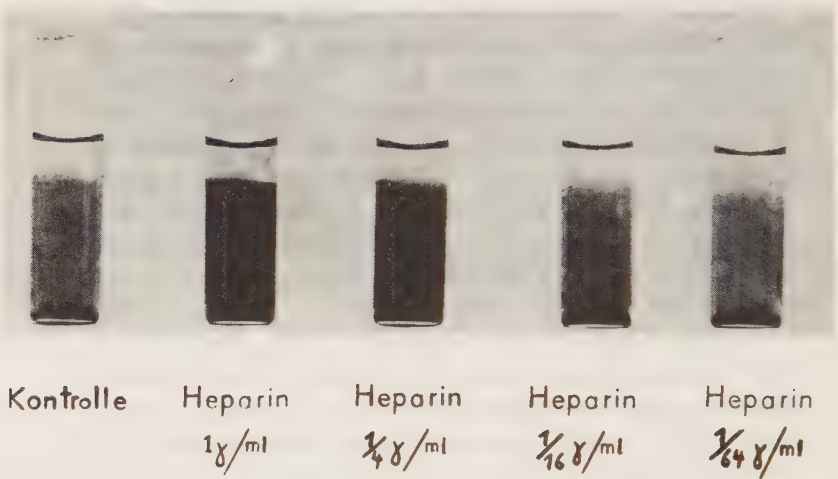
Hämaggregationshemmende Agentien können nur dann spezifisch nachgewiesen werden, wenn sich ihre Aktivität durch entsprechende Enzyme oder

durch homologe Antikörper neutralisieren läßt. 1968 zeigten Drescher und Gillissen, daß die hämaggregationshemmende Aktivität von Tuberkulin durch Seren von Tuberkulosekranken und BCG-immunisierten Kaninchen aufgehoben werden kann (14, 20). Wenn es gelingt, ein auch quantitativ standardisiertes Antituberkulinserum zu entwickeln, so wäre der spezifische Nachweis von Tuberkulin im Hämaggregationstest möglich.

Für Heparin konnte gezeigt werden, daß seine hämaggregationshemmende Aktivität durch Protaminsulfat aufgehoben wird. Protamin bildet mit Heparin ein Salz (4). Die Affinität von Protamin zu Heparin ist größer als zu anderen biologischen Reaktionspartnern (39). Dennoch kann die Neutralisation von Heparin durch Protamin nicht als spezifisch gelten, da Protamin auch andere Substanzen (z. B. Insulin, Nukleinsäuren) bindet (39). Der spezifische Heparinnachweis könnte im H-Test nur mit einer Heparinase durchgeführt werden, wie sie z. B. aus *Flavobacterium heparini* vereinzelt isoliert wurde (36).

Zur Zeit können demnach nur reine Tuberkulin- und Heparinpräparate titriert werden. Der Nachweis von Heparin und Tuberkulin aus unbekannten Proben (z. B. Serum) gelingt mit der photometrischen Hämaggregationsmethode wegen ihrer Unspezifität nicht.

Abb 5 : Die Abhängigkeit der Hämaggregation
von der Heparinkonzentration



Hohe Heparinkonzentrationen ($1\gamma/\text{ml}$) hemmen die Hämaggregation stark und verhindern die rasche Sedimentation der Aggregate. Niedrige Heparinkonzentrationen ($1/64\gamma$ pro ml) verursachen keinen meßbaren Unterschied zur heparin-freien Kontrolle.

Tab 7 : Vergleich der Reaktionen von
Tuberkulin⁺ und Heparin⁺⁺ im H-Test

	Tuberkulin	Heparin
hämaggregationshemmende Aktivität (HIU pro mg ⁺) ⁺		
Mittelwert	46 400	1 045 000
Standardabweichung	11 470	171 500
Variationskoeffizient	0,25	0,16
Protaminkonzentration, die 1 000 HIU zu 50% neutralisiert (C _{50%})		
Mittelwert	2,5mg/ml	0,88mg/ml
Variationskoeffizient	0,34	0,23

+ gereinigtes Tuberkulin Hoechst

++ Heparin LaRoche

+++ hemaggregation inhibiting units

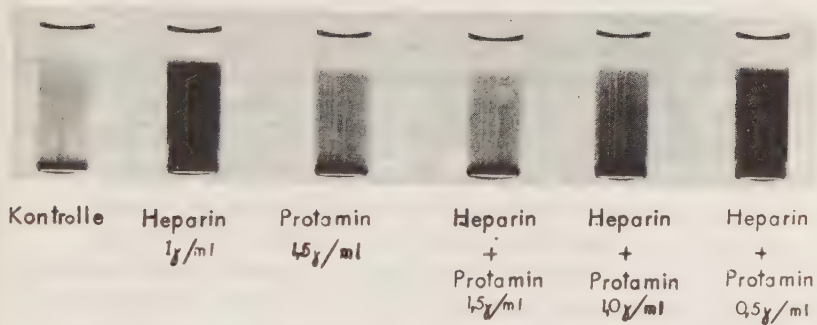
2) Die Neutralisation von Heparin und Tuberkulin durch Protaminsulfat

Die Versuche zeigen, daß Protaminsulfat die hämaggregationshemmende Aktivität sowohl von Heparin als auch Tuberkulin neutralisiert. Das Ausmaß der Neutralisation ist der verwendeten Protaminkonzentration proportional und es gelingt, die tuberkulin- bzw. heparinneutralisierende Aktivität eines Protaminpräparates reproduzierbar zu messen (s. Abb. 7).

Eine Tuberkulinprobe benötigt zur Neutralisation etwa die dreifache Menge Protamin wie eine gleich starke Heparinprobe (s. Tab. Nr. 7). Das heißt: die neutralisierende Aktivität des Protamin ist gegenüber Heparin größer als gegenüber Tuberkulin. Dies erklärt sich aus der hohen Affinität zwischen Protamin und Heparin, die auch in der medizinischen Therapie ausgenutzt wird (37).

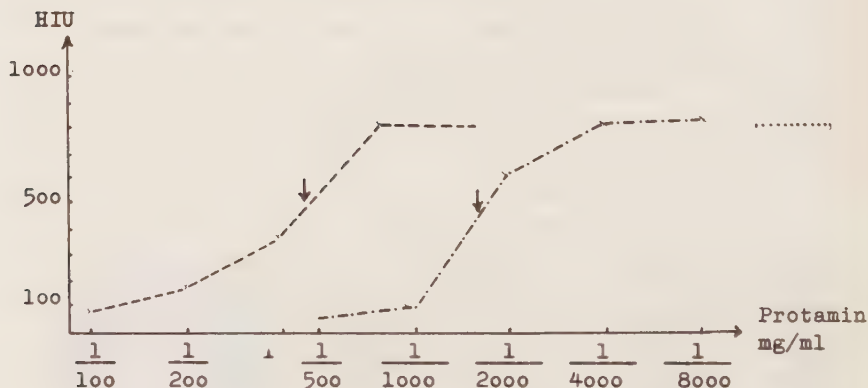
Drescher nimmt an, daß die hämaggregationshemmenden Agentien das Oberflächenpotential der Erythrocyten ändern. Unsere Ergebnisse können diese Hypothese stützen und weisen darauf hin, daß es zumindest beim Tuberkulin und Heparin die durch Protamin neutralisierbaren anionischen Gruppen des Polyions sind, die die Suspensionsstabilität der roten Blutzellen erhöhen und dadurch die Hämaggregation hemmen.

Abb 7 : Die Neutralisation der Heparin-
wirkung durch Protaminsulfat



Hohe Protaminkonzentrationen neutralisieren Heparin vollständig; die Lichtextinktion entspricht der einer heparinfreien Kontrolle. Niedrige Protaminkonzentrationen neutralisieren Heparin nicht; die Lichtextinktion entspricht der einer heparinhaltigen Kontrolle ohne Protaminzusatz.

Abb 7 : Die Neutralisation gleich starker
hämaggregationshemmender Aktivitäten
von Tuberkulin und Heparin



HIU hemaggregation inhibiting units
 -----Tuberkulin(1/40 mg/ml)-Protaminmischung
 -.-.-Heparin(1/1600 mg/ml)-Protaminmischung
Tuberkulin und Heparin ohne Protamin = 850HIU
 ↓ Protaminkonzentration, die 50% der hämaggre-
 gationshemmenden Aktivität neutralisiert

Erklärung: Hohe Protaminkonzentrationen neutrali-
 sieren die HAH Aktivität vollständig, niedrige
 Konzentrationen neutralisieren nicht.
 Tuberkulin benötigt zur Neutralisation höhere
 Protaminmengen als Heparin.

b) Die Bedeutung der Reaktion von Heparin im H-Test

1) Vergleich mit anderen Heparin-Nachweismethoden

Im H-Test kann eine Heparinkonzentration von $1 \mu\text{g/ml}$ mit einer Standardabweichung von 16% erfaßt werden. Es stellt sich die Frage, ob die Empfindlichkeit und die Genauigkeit dieses Nachweises größer ist als die anderer bisher üblicher Methoden.

Heparin reagiert in dem 1967 von Tyrrell entwickelten haemaggregation-pattern-test. Erythrocyten, die nach den Vorschriften des H-Testes behandelt wurden, bilden in konkaven Plastikschaalen ein charakteristisches Sedimentationsmuster, weil sie teilweise an der Schalenwand haften. Unter dem Einfluß von Heparin verlieren die roten Blutzellen ihre Haftfähigkeit und sinken zum tiefsten Punkt der Schale, wo sie dicht gedrängt liegen bleiben. Die niedrigste Heparinkonzentration, die eine solche Änderung des Sedimentationsmusters herbeiführt, wird als Titer angegeben und betrug bei den Untersuchungen Tyrrells 0,6 IE (= 6 Gamma) pro ml. Demnach ist der Heparinnachweis im H-Test mit deutlich höherer Empfindlichkeit als im pattern-test möglich. Die Fehlerbreite, Reproduzierbarkeit und die Spezifität des Heparinnachweises im pattern-test wurden bisher noch nicht untersucht und können deshalb mit den Ergebnissen des H-Testes nicht verglichen werden

Die Methoden, die meist zur quantitativen Heparinbestimmung angewendet werden, sind der Antithrombin-nachweis (22) und die Protamintitration (22), die beide eine Heparinkonzentration von 1-2 γ /ml erfassen können. Die Empfindlichkeit dieser Methoden liegt also in der gleichen Größenordnung wie die des H-Testes. Neuere Verfahren, die auf der Inaktivierung von RNS durch Heparin beruhen, lassen sogar 0,35/ml nachweisen (47). Daß dermaßen geringe Heparinkonzentrationen erfassbar sind, könnte für die Erforschung des H-Testes wertvoll sein. Untersuchungen über den Mechanismus der Hämaggregationshemmung sind nämlich unter anderem dadurch erschwert, daß die hämaggregationshemmenden Substanzen in sehr geringer Konzentration in den Test eingehen. Diese niedrigen Konzentrationen können durch andere Methoden nicht mehr quantitativ analysiert werden. Dies gilt für DNS (7, 13), RNS (35, 13) und besonders für Viren und Tuberkulin. Der Verbleib dieser Substanzen in der Reaktion (z. B. ihre Adsorption an Albumin oder an Erythrocyten) kann nicht verfolgt werden. Da die in den H-Test eingehenden Heparinkonzentrationen auch mit anderen Methoden gemessen werden können, bietet sich Heparin zum Studium des Mechanismus des H-Testes an. Die durch Heparin gefundenen Ergebnisse dürften mit großer Wahrscheinlichkeit wegen der formalen Gleichheit der Reaktionen (s. Seite 33 s. o.) auf andere hämaggregationshemmende Substanzen übertragbar sein.

2) Die Meßbarkeit der hämaggregationshemmenden Heparinwirkung

Die sechs getesteten Heparinpräparate ungleicher Provenienz besitzen unterschiedlich starke hämaggregationshemmende Aktivitäten. Diese Unterschiede treten auf, wenn die HIU (hemaggregating inhibiting units) auf die Gewichtseinheiten (mg Trockensubstanz) oder auf die antikoagulatorischen Einheiten (USP.E) bezogen werden (s. Tab. Nr. 4). Die natürlichen Heparine sind Gemische aus Heparinmono-di-tri-Schwefelsäureestern (25), und selbst die Bestandteile dieser Gemische sind in sich inhomogen; je nach Tierspezies und Organ variiert ihr Sulfurierungsgrad (19) und ihr Polymerisationsgrad (32). Deshalb sind auch biologische Heparineigenschaften ungleich stark in den einzelnen Präparaten vertreten. So vergleicht z. B. Gastpar die antikoagulatorische Aktivität und die metachromatische Aktivität von sieben Handelspräparaten, und findet, daß in einigen die antikoagulatorische Aktivität in anderen die metachromatische Aktivität verhältnismäßig hoch ist (18). Es nimmt deshalb nicht wunder, daß die hämaggregationshemmende Aktivität der natürlichen Heparine weder mit ihrer antikoagulatorischen Aktivität noch mit ihrem Gewicht streng korreliert ist. Offensichtlich wird die hämaggregationshemmende Aktivität eines Heparinpräparates durch andere chemische Eigenschaft verursacht als seine antikoagulatorische Aktivität. Ob der Sulfurierungsgrad, die sterische Anordnung oder der Polymerisationsgrad eines Heparinmoleküls seine hämaggregationshemmende Aktivität bedingen, muß vorerst offen bleiben.

Heparin wurde von mehreren Autoren zur Therapie der intravasalen Erythrocytenaggregation (sludged bloodphänomen) angewendet (47, 30, 29, 40). Durch welchen Mechanismus Heparin dabei die Erythrocytenaggregate löst, ist nicht entschieden. Es soll jedoch an der Erythrocytenoberfläche adsorbiert werden und dadurch die Suspensionsstabilität der roten Blutzellen erhöhen (45, 18, 23). Die beschriebenen Versuche zeigen, daß Heparin eine ähnliche Wirkung auf Erythrocyten unter den Bedingungen des Hämaggregationstestes hat. Daß die in vitro gefundenen Ergebnisse ohne weiteres auf die in vivo Verhältnisse übertragen werden können, ist unwahrscheinlich. Dennoch bietet sich der Hämaggregationstest als Modell an, um die Heparinwirkung auf intravasale Erythrocytenaggregate zu erforschen. Zur Zeit kann die Aktivität, mit der Heparin die Suspension roter Blutzellen stabilisiert, im photometrischen Hämaggregationstest empfindlich und quantitativ gemessen werden. Es bleibt zu prüfen, ob eine Parallelität zwischen der hämaggregationshemmenden Aktivität von Heparin und seinem anti-sludge Effekt besteht.

ZUSAMMENFASSUNG

Der photometrische Hämaggregationstest, mit dem Drescher Viren, Nukleinsäuren und Tuberkulin titrierte, eignet sich auch zur Titration von Heparin. Die beschriebenen Untersuchungen vergleichen das Verhalten von Tuberkulin und Heparin im H-Test und zeigen:

- 1) Die hämaggregationshemmenden Aktivitäten von Heparin und Tuberkulin können reproduzierbar gemessen werden. Die Aktivität von Heparin liegt mit 1 045 000 HIU pro mg (Variationskoeffizient $V = 0,16$) höher als die des Tuberkulins mit 46 400 HIU pro mg ($V = 0,25$).
- 2) Protaminsulfat neutralisiert den hämaggregationshemmenden Effekt von Heparin und Tuberkulin. Die heparinneutralisierende Aktivität von Protamin ist etwa dreifach so groß wie seine tuberkulinneutralisierende Aktivität. Dies wird durch die hohe Affinität zwischen Protamin und Heparin erklärt.
- 3) Bei Heparinpräparaten unterschiedlicher Provenienz ist das Verhältnis der hämaggregationshemmenden Aktivität zur anti-koagulatorischen Aktivität nicht gleich. Dies erklärt sich aus der chemischen Inhomogenität der natürlichen Heparine.

Es wird diskutiert, ob die im photometrischen Hämaggregationstest gemessene Heparinaktivität ein Maß für seine Wirkung auf intravasale Erythrocytenaggregate (sludged-blood Phänomen) ist.

Literaturverzeichnis

- 1) Bally, P. R.: Über die klinische Bedeutung des Heparins Z. für klin. Med. Bd. 148 S. 295-330 (1951)
 - 2) Bergmeyer, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie Weinheim 1962 S. 82-83
 - 3) Berlin, R.
Sandring, H.: Increased suspension stability of blood after heparin administration Acta Med. Scand. 169: 369-372 (1961)
 - 4) Brimacombe, Webber: Mucopolysaccharides BBA Library Vol 6 S. 118 Elsevier Publishing Company Amsterdam 1964
 - 5) Chargaff, E.: Studies on chemistry of blood coagulation protamines and blood clotting, J. Biol. Chem. 125: 671-676 (1938)
 - 6) Clarke, D.W.,
F.C. Monkhouse: Canac. J. med. Sci 31: 394 (1953)
 - 7) Dische, Z.: Über einige charakteristische Farbreaktionen der Thymonukleinsäure und eine Mikromethode zur Bestimmung derselben in tierischen Organen mit Hilfe dieser Reaktion-Mikrochemie 8 (1930) S.4
 - 8) Ditzel, J.: The nature of the intravascular erythrocyte aggregation in disease with particular reference to diabetes mellitus. Acta med. Scand. 152 S. 371 (1955)
 - 9) Drescher, J.: Über Hämagglutinin- und Antikörpergehaltsbestimmung II Mitteilung. Zbl. Bacteriol. I Orig 169, 1957 (s. 461-470)
 - 10) --- Schrader, K., Titration of poliovirus and influenza virus by means of the hemaggregation test Amer J. Hyg 79 218-35 (1964)
 - 11) --- Gillissen, G.: Die Titration von Tuberkulin und Tuberkulinantikörpern mittels des photometrischen Hämaggregations-testes I Mitteilung ZblG. Bakt. 1 Orig 200 S. 480-492 (1966)
 - 12) --- ----- II Mitteilung Zbl G. Bakt. 201 S. 65-74
 - 13) --- Assay of Nuclein Acids by Means of the Photometric Hemaggregation Test +
 - 14) --- and Gillissen. Assay of tuberculin antibody by means of the photometric hemaggregation test. I. Description of the methode American Journal of Epidemiology Vol 87 Nr. 2 S. 326 (1968)
- + Arch. Biochem. Biophys. 121, 346-351 (1967)

- 15) Engelberg, H.: Heparin, Metabolism. Physiology and Clinical Application. Charles C. Thomas Publisher Springfield Illinois USA 1963
- 16) Fahraeus, R.: Acta med. Scand. 55,1 (1921)
- 17) Fischer, A.: Über den Reaktionsmechanismus der Blutgerinnung. Biochem. Ztschr. 259: 67-75 (1933)
- 18) Gastpar, H.: Physiologische Bedeutung und pharmakologische Wirkung des Heparins Schattauer Verlag Stuttgart 1965
- 19) Gibian, H.: Mucopolysaccharide und Mucopolysaccharidasen Einzeldarstellungen aus dem Gesamtgebiet der Biochemie IV. Band Hoffmann-Ostenhofen Wien 1959
- 20) Gillissen, G. and Drescher, J.: Assay of tuberculin antibody by means of the photometric hemaggregation test II Comparative titration of antibody by hemaggregation test and by conventional techniques Americ. Journ. Epidemiology Vol 87 Nr. 2 S. 339 (1968)
- 21) Jaques, L. B.: Reaction of heparin with proteins and complex bases Biochem J. 37: 189-195 (1943)
- 22) --- Bell J. H.: Determination of Heparin Methods of biochem. Analysis Volume VII 1959
- 23) Jones, G., Wood, L.A.: J. Chem Phys 13: 106 (1945)
- 24) Jorpes, E.: On heparin, its chemical nature and properties Acta med Scand 88: 427-433 (1936)
- 25) --- Gardell: J. Biol Chem. 176: 267 (1948)
- 26) Karlson, P.: Lehrbuch der Biochemie, Georg Thieme Verlag 1966 S. 273
- 27) Kaulla v.K.N., Henkel, W.: Heparinadsorption durch Erythrocyten Schweiz med Wo 82: 1128-30 (1952)
- 28) Koch, Robert Deutsche Med Wochenschrift Bd 17 (1891) S. 101
Fortsetzung der Mitteilungen über ein Heilmittel gegen Tuberkulose
- 29) Lange K., Kiener, D., Boyd, L.: Frostbite: physiology, pathology and therapy New England J. 237: 383 (1947)
- 30) Laufmann, H., Martin, W., Tanturi C.: Effekt of heparin and dicoumarol on sludge formation Science 108: 283-284 (1948)
- 31) Lindner, F.: Über die Chemie des Tuberkulins Behringwerk-Mitteilungen 1953, Heft 27 S. 3
- 32) Marbet, R.A., Winterstein: Experimentia (Basel) 8:41 (1952)
- 33) Mayoux, R., Rebattu J.P.: d'heparine dans le traitement de la surdite, des bourdonnements et des vertiges. Presse med 64 (2) (1956)

- 34) McLean, J.: Amer.J. Physiol 41: 250 (1916)
- 35) Mejbaum, W.: Über die Bestimmung kleiner Pentose-
mengen insbesondere in Derivaten der
Adenylsäure. Z. Physiol. Chem 258
S. 117 (1939)
- 36) Payza, A. N., J. Biol Chem. 223 (1956) 853
Korn, E. D.:
- 37) Römpf, H.: Chemie Lexikon Band III Frank'sche
Verlagsbuchhandlung Stuttgart 1966
- 38) Roth, K.L., Fed Proc 17: 407 (1958)
Frumin, A.M.:
- 39) Seitz, W., Heparin und Lipämie
Zöllner, N.: Medizinische pp 955-957 (1955)
- 40) Timonen, S., sludged blood in allergy
Zilliacus, H.: acta med Scan 135: 292-297 (1949)
- 41) Tischer, I.: Untersuchungen mit einer neuen Methode
zur Wertbemessung von Virussuspensionen
Zbl f. Bakt. I Orig. 191 S. 104-107
(1963)
- 42) Tyrrell, D.A.J., B. Head, M. Dimic: Titration of Tuber-
culin, nucleic acids and viruses by
haemaggregation inhibition using a
pattern test. Brit. J. exp. Path
48, 518 (1967)
- 43) Walton, K.W.: Chemistry and mode of action of heparin
and related compounds. Brit. M. Bull 11
62-69 (1955)
- 44) Weis-Fogh, J.: Aggregation of erythrocytes in small
blood vessels. Scand J. Clin Lab Inves
9 suppl 28 (1957)
- 45) Winterstein, A.: Antikoagulantien in der Humanmedizin
III Hamburger Symposium über Blutge-
rinnung Schattauer Verlag 1960
- 46) Wood, L.A.: Blood clotting and allied problems
3. Conf. J. Macy Foundation New York
1950
- 47) Zöllner, N., Methoden der enzymatischen Analyse
Lorenz, B.: H.U. Bergmeyer Verlag Chemie Weinheim
1962
- 48) Zsoter, T.M., Szabo, G. Lusztig: Study on heparin effect on
the mesoappendix of rats.
Z. exp. Med 127: 256 (1956)

Herrn Professor Dr.med.Georg Henneberg
(Direktor des Robert Koch-Institutes Berlin)
bin ich für die Überlassung des Themas und
für die Beratung bei dessen Bearbeitung zu
großem Dank verpflichtet.Gleichfalls möchte
ich mich bei Herrn Professor Dr.med.J.Drescher
(Institut für Mikrobiologie der Medizinischen
Hochschule Hannover) für seine wesentlichen
Ratschläge bedanken.

Lebenslauf

Am 26.8.1941 wurde ich als Sohn des Ministerialrates Klaus Lange und seiner Frau Sigrid Lange, geb. Schneider, in Prag geboren.

Ich wuchs in Halle an der Saale auf und ging dort zur Grundschule. Ab 1952 besuchte ich in Bonn am Rhein den humanistischen Zweig des Nicolaus Cusanus Gymnasiums, wo ich im Frühjahr 1961 das Abitur machte. Im vorletzten Jahr meiner Gymnasialzeit war ich Austauschschüler an einer amerikanischen High School in Upland/Kalifornien und bestand die dort übliche Abschlußprüfung, die graduation.

An der Freien Universität Berlin studierte ich Medizin und absolvierte 1967 die ärztliche Prüfung. Das Studienjahr 1965 verbrachte ich als Stipendiat der französischen Regierung an der faculté de médecine in Bordeaux. Von Herrn Professor Henneberg erhielt ich 1966 das Thema meiner Dissertation.

Ich bin mit der Medizinalassistentin Maritta Lange geb. Thomas, verheiratet. Mein Sohn Constantin wurde im April 1968 geboren. Seit Dezember 1967 arbeite ich als Medizinalassistent in Berlin.

